

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН  
Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

**Материалы**  
**Всероссийской молодежной гидробиологической конференции**

**«ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРОБЛЕМЫ  
СОВРЕМЕННОЙ ГИДРОБИОЛОГИИ»**

**Борок, 2016**

Viarengo A., Pertica M., Canesi I., Biasi F., Cecchini G., Orunesu M., 1988. Effects of heavy metals on lipid peroxidation in mussel tissues // Marine Environmental Research. V. 24. № 1–4. P. 354–358.

Winston G.W., 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals // Comparative Biochemistry and Physiology. V. 100. № 1–2. P. 173–176.

УДК 574.24

Е.С. Соломонова

ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН», г. Севастополь  
e-mail: solomonov83@mail.ru

### Оценка жизнеспособности микроводорослей по вариабельности размерного спектра клеток при акклимации к различной температуре

**Резюме.** Исследована вариабельность размерного спектра клеток накопительных культур морских водорослей на разных этапах их роста при акклимации к различной температуре. Отмечено, что изменение объёмов клеток водорослей не является существенным показателем, указывающим на деградацию культур или потерю их жизнеспособности. Коэффициент вариации клеточных размеров представляет собой более чувствительный параметр при рассмотрении гибели культур и может лежать в основе косвенного критерия, используемого для определения жизнеспособности микроорганизмов. Установлено, что высокие значения коэффициента вариации средних объёмов клеток исследуемых видов получены в стационарной фазе их роста и при низкой температуре, что свидетельствует о переходе водорослей из состояния гомеостаза в стресс и о возрастании количества мертвых и неактивных клеток.

Фотоавтотрофные микроорганизмы являются основным продуцирующим звеном водной среды, поэтому стабильность их функционирования и жизнеспособность будут в первую очередь определять устойчивость поведения всей экосистемы в целом. Маркерами жизнеспособности клеток водорослей могут выступать ее структурные и функциональные элементы, такие, как мембрана и мембранная проходимость, протеины (ферменты) и их активность, рибосомы и их функциональность, ферментативные реакции, накопление АТФ, морфологические признаки, а также изменение клеточных размеров. Стрессовые условия окружающей среды способствуют возрастанию мёртвых и неактивных клеток, что приводит к снижению жизнеспособности популяции в целом. Мертвые и неактивные клетки обладают отличными от живой клетки размерами: из-за деструктивных изменений в мембранах хлоропласта (слипание фотосинтетических мембран и увеличение интрамембранного пространства), таким клеткам свойственно разбухание пластид, прогрессирующая вакуолизация, результатом чего является деплазмолиз и изменение формы клеток (Попова и др., 2004). В связи с чем, вариабельность клеточного размера может косвенным путем указывать на изменение функционального состояния водорослей, что в сочетании с проточной цитометрией является быстрым и простым подходом в оценке их жизнеспособности.

Цель работы заключалась в определении вариабельности размерного спектра клеток водорослей, в зависимости от действия различной температуры.

В качестве объекта исследования были использованы альгологически чистые культуры диатомовой водоросли *P. tricornutum* (Bohlin, 1897) и *Chlorella vulgaris suboblonga* из коллекции отдела экологической физиологии водорослей ФГБУН ИМБИ. В ходе эксперимента водоросли культивировали на питательной среде F/2 при интенсивности света  $34.4 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  и температурах 10 и 20°C.

Пробы культур исследовали с помощью проточного цитометра Cytomics™ FC 500 (Beckman Coulter, США), оборудованного 488 нм однофазным аргоновым лазером, и

программным обеспечением СХР. Методика определения численности клеток на проточном цитометре опубликованы ранее (Соломонова, Муханов, 2010). Расчет объемов клеток водорослей производили в соответствии с калибровкой (Соломонова, Акимов, 2014).

Для оценки уровня изменчивости на основании коэффициента вариации использовали шкалу А.С. Мамаева (Мамаев, 1968). Достоверность результатов исследований определяли с помощью критерия Стьюдента (Лакин, 1990).

Во всех вариантах опыта временной ход увеличения концентрации клеток *Ch. vulgaris suboblonga* и *Ph. tricornutum* описывается типичной S-образной кривой. При температуре 20°C лаг-фаза была минимальной, при росте водорослей на 10°C период лаг-фазы составил восемь и семь суток для *Ch. vulgaris suboblonga* и *Ph. tricornutum* соответственно.

При акклимации *Ch. vulgaris suboblonga* к температуре 20°C не наблюдалось существенных различий в объемах клеток ( $V=45 \text{ мкм}^3$ ). Отмечалось небольшое уменьшение объемов клеток в стационарной фазе. Средние значения объемов клеток *Ch. vulgaris suboblonga* при адаптации к температуре 10°C были в 1.5 раза выше в лаг-фазе, что связано с задержкой клеточного деления роста микроводорослей. По мере роста культуры объем клеток оставался неизменным и соответствовал объему клеток культуры, адаптированной к 20°C.

Средние значения объемов клеток *Ph. tricornutum*, адаптированной к низкой температуре были в 2 раза выше, чем при температуре 20°C, что, возможно, также объясняется задержкой клеточного деления.

Метод проточной цитометрии позволяет определить дисперсию исследуемых групп водорослей, как по размерам (боковое рассеяние FS), так и по автофлуоресценции клеток (FL4). Об увеличении размеров клеток водорослей свидетельствуют сдвиги кластеров вправо в системе координат FS-FL4. О величине дисперсии исследуемых параметров можно судить по «вытянутости» кластера по осям абсцисс (FS) и ординат (FL4).

При оптимальной температуре в экспоненциальной фазе роста водорослей изменчивость клеточного объема, согласно шкале Мамаева (Мамаев, 1968), была невысокой, увеличение коэффициента вариации в два раза наблюдали при переходе культур в стационарное состояние. При акклимации *Ph. tricornutum* и *Ch. vulgaris suboblonga* к 10°C высокие значения CV (более 30%) получены на протяжении всего их роста. Высокая изменчивость объемов клеток при низкой температуре и в стационарной фазы роста исследуемых видов водорослей свидетельствует об изменении морфологии клеток водорослей и перестройках в метаболических процессах, вызванных низкой температурой. Полученные результаты дают возможность использовать коэффициент вариативности в качестве одного из маркеров жизнеспособности водорослей, так как подтверждает ранее полученные данные, что переход водорослей в стационарную фазу роста или рост в субоптимальных для них условиях способствуют физиологической неоднородности клеток, т.е. увеличению количества мертвых и неактивных клеток. Данный показатель жизнеспособности целесообразно использовать в качестве дополнения к основным методам исследования, однако, анализ размерной структуры оказывается более информативным, чем простой подсчет численности клеток водорослей, и его можно использовать как диагностический признак состояния популяций.

### Список литературы

Лакин Г.Ф., 1990. Биометрия. Учебное пособие для биол. спец. вузов, 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.

Мамаев С.А., 1975. Основные принципы методики исследования внутривидовой изменчивости древесных растений // Индивидуальная и эколого-географическая изменчивость растений. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1975. С. 3–14.

Попова А.Ф., Паршикова Т.В., Кемп Р., 2004. Влияние катамина на структурно-функциональные характеристики клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Dang // Альгология. Т. 14. № 3. С. 229–239.

Соломонова Е.С., Акимов А.И., 2014. Соотношение мёртвой и живой компоненты взвеси в культурах микроводорослей в зависимости от стадии роста и освещённости // Морской экологический журнал. Т. 1. С.73–81.

Соломонова Е.С., Муханов В.С., 2011. Оценка доли физиологически активных клеток в накопительных культурах *Phaeodactylum tricornutum* и *Nitzschia* sp. помощью проточной цитометрии // Морской экологический журнал. Т. 10. № 4. С. 67–72.

УДК 574.23/24

Е.С. Соломонова, А.И. Акимов, Н.Ю. Шоман

ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН», Севастополь  
e-mail: solomonov83@mail.ru

### **Влияния света и температуры на коэффициент переменной флуоресценции и FDA активность, их сопоставление с ростовыми характеристиками, внутриклеточным содержанием хлорофилла на примере водоросли *Phaeodactylum tricornutum***

**Резюме.** Исследовано влияние света и температуры на коэффициент переменной флуоресценции, FDA<sub>п</sub> активность, удельную скорость роста и внутриклеточное содержание хлорофилла диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1897). Получено, что в широком диапазоне освещенности и температуры коэффициент переменной флуоресценции и FDA<sub>п</sub> активность сохраняли высокие значения, в этих пределах интенсивность света и температура не являются маскирующими или препятствующими факторами для применения методов в практике гидробиологических исследований. При экстремально высокой освещенности (выше 800 мкЕ м<sup>-2</sup>) и температуры (28°C) наблюдается падение показателей переменной флуоресценции FDA<sub>п</sub> активности, что связано со снижением функционального состояния исследуемых видов водорослей, остановки их роста, и непосредственной гибели клеток.

В морской гидробиологии, а также в исследованиях по интенсивному культивированию микроводорослей, все чаще начинают применяться экспресс методы оценки функционального состояния водорослей, их продукционного потенциала под влиянием внешних условий, в том числе, в связи с антропогенными факторами среды. Такими методами являются, в частности, применение коэффициента переменной флуоресценции (К), характеризующий эффективность переноса и утилизацию энергии в первичных фотохимических процессах (Маторин, Алексеев, 2013), и FDA анализ связанный с активностью ферментов группы эстераз, катализирующих реакции гидролиза сложноэфирных связей (Jochem, 1999). Данный параметр (FDA<sub>п</sub>) предложен нами ранее, как интегральный показатель метаболической активности клеток, реализуемый путем окраски суспензии клеток водорослей витальным красителем диацетат флуоресцеинном (Соломонова, Акимов, 2012).

Вместе с тем реализация этих методов осуществляется на фоне различных уровней светового и температурного факторов, роль которых сама по себе велика.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния света и температуры на параметры коэффициента переменной флуоресценции (К) и FDA<sub>п</sub>, их сопоставление с ростовыми характеристиками, внутриклеточным содержанием хлорофилла на примере водоросли *Phaeodactylum tricornutum* в условиях обеспеченности биогенными элементами (среда f/2).

*Влияние световых условий.* В диапазоне интенсивностей от 0.7 до 200 мкЕ м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup> (примерно 1.5 раза превышала насыщающую освещенность скорости роста *Phaeodactylum tricornutum*) наблюдались высокие устойчивые значения показателя переменной флуоресценции (0.63-0.7), которые были близки максимальным значениям этого параметра приводимого в литературе для фитопланктона (так и в культурах) вегетирующего в